

①⑨ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

①⑫ Offenlegungsschrift  
①⑪ DE 38 10 803 A 1

⑤① Int. Cl. 4:  
A61L 27/00  
C 12 N 5/00

②① Aktenzeichen: P 38 10 803.8  
②② Anmeldetag: 30. 3. 88  
④③ Offenlegungstag: 12. 10. 89

Behördeneigentum

DE 38 10 803 A 1

⑦① Anmelder:  
Battelle-Institut eV, 6000 Frankfurt, DE

⑦② Erfinder:  
Heide, Helmut, Dr., 6233 Kelkheim, DE; Jones,  
David, Dr., 4400 Münster, DE

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Verfahren zur Herstellung eines synthetischen Knochenmaterials mit körpereigenen Eigenschaften

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung eines synthetischen Knochenmaterials mit körpereigenen Eigenschaften.

Hierbei werden menschliche Knochenzellen (Präosteoblasten und Osteoblasten) extrakorporal auf dem dem knochenähnlichen Material ähnlich calciumphosphatischen Werkstoffen, Substratmaterialien in Form von Biopolymeren oder Mischungen aus beiden gezüchtet.

DE 38 10 803 A 1

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung lebender Knochenersatzmaterialien durch extrakorporale Züchtung autogener Knochenzellen auf Calciumphosphatmaterial und/oder organischen Substanzen, wobei ein "Verbundmaterial" entsteht, welches dem Patienten reimplantiert werden kann, von dem zuvor entsprechende Knochenzellen entnommen wurden.

In der orthopädischen Chirurgie besteht ein dringender Bedarf an Knochenersatz, mit dem auch größere Defekte überbrückt und geheilt werden können. Solcher Knochenersatz findet Einsatz z. B. bei folgenden Indikationen:

- In der Traumatologie bei ausgedehnten Trümmerbrüchen und großen Defekten;
- bei onkologischen Operationen zur endgültigen Stabilisierung und Ausfüllung des Defektes;
- bei schweren Wirbelsäulendeformitäten werden in großem Umfang Knochen transplantiert;
- beim künstlichen Gelenkersatz;
- in der Kieferchirurgie u. a.

Da autologer Knochen (d. h. Knochen desselben Patienten) nur im begrenzten Maße zur Verfügung steht, wurden bisher homologe Knochen aus der Knochenbank eingesetzt. Bei ständig steigendem Bedarf wird das Angebot an immunologisch geeignetem Material jedoch zunehmend geringer. Deshalb ist z. B. schon versucht worden, keramische Werkstoffe auf der Basis von Calciumphosphaten, denen eine gewisse osteo-induktive Wirkung zugeschrieben wird, in die betreffenden defekten Stellen des Körpers einzusetzen. Derartige Möglichkeiten konnten aber die Aufgabe zur Therapie größerer Knochendefekte nicht erfüllen, weil nur kleinere Defekte überbrückt werden könnten. Die biologische Wirkungsweise derartiger Materialien ist zudem nach wie vor unklar.

Es ist daher Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Knochenmaterial mit körpereigenen Eigenschaften herzustellen, das von seinen Ausmaßen her genügend groß ist, um auch größere Defekte überbrücken zu können.

Die Lösung dieser Aufgabe besteht im Prinzip darin, knochenbildende Zellen, wie z. B. Osteoblasten aus der Zellkultur, extrakorporal mit calciumphosphatischen Werkstoffen, die chemisch dem Knochenmaterial ähnlich sind, und/oder Substratmaterialien in Form von Biopolymeren zu kombinieren und auf diesen Materialien zu kultivieren. Dabei sollen die gewissermaßen als Matrix dienenden Werkstoffe und Substratmaterialien so beschaffen sein, daß sie günstige Lebensbedingungen für die extrakorporale Entwicklung von lebenden Knochenzellen bieten, so daß sich diese auch gut vermehren lassen.

Es wurde nun überraschend gefunden, daß die Verwendung calciumphosphatischen Materials einer Zusammensetzung möglichst nahe dem Verhältnis  $\text{CaO}:\text{P}_2\text{O}_5=3:1$  diese Anforderungen erfüllt. Diesem Verhältnis entsprechen die Verbindungen Tricalciumphosphat und Hydroxylapatit (vgl. Abb. 3). Hiermit wurde es möglich, auch eine kurzfristige Generierung von Knochenmaterial zu gewährleisten.

Eine besonders vorteilhafte Verfahrensmaßnahme besteht darin, die auf den CaP-Matrizen abgelagerten Zellkulturen in Zellgeneratoren (Abb. 1) ständig von Nährlösung umströmen zu lassen, um sie so optimal mit der Nährlösung zu versorgen sowie gleichzeitig lokale

Übersättigungszustände aus den lebenden Zellkulturen zu beseitigen.

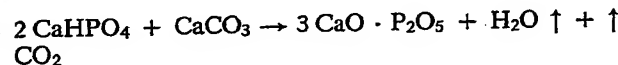
Das vorzugsweise poröse CaP-Matrixmaterial kann durch seine äußere Erscheinungsform, z. B. Granulate oder monolithische Formteile mit durchgehenden Poren (Abb. 2 b) optimal an unterschiedliche Indikationssituationen angepaßt werden.

Ähnlich positive Ergebnisse konnten mit Substratmaterialien in Form von Biopolymeren wie Kollagen Typ I erzielt werden. Kombiniert man die erfindungsgemäßen Biopolymere mit den erfindungsgemäßen CaP-Materialien, so läßt sich das Ergebnis des erfindungsgemäßen Verfahrens noch weiter verbessern.

## Beispiele:

## 1. CaP-Matrix

Als eine besonders günstige Ausführungsart für die CaP-Matrizen wurde die Verbindung Tricalciumphosphat ( $\beta$ -Whitlockit) aus stöchiometrischen Mischungen aus  $\text{CaHPO}_4$  und  $\text{CaCO}_3$  durch Sintern über mehr als 8 h bei  $1100^\circ\text{C}$  gemäß der Formel



hergestellt, die entstandenen massiven Probematerialien wurden spanabhebend und mittels Bohren in durchgängig poröse Formstücke (Abb. 2 b) überführt.

Hierbei muß durch diese Wahl der Synthesbedingungen sichergestellt sein, daß die gemäß Abb. 3 mit Tricalciumphosphat ( $3 \text{CaO} \times \text{P}_2\text{O}_5$ ) koexistierenden Phasen Dicalcium- und Tetracalciumphosphat möglichst nicht gebildet werden bzw. durch möglichst vollständigen Umsatz verschwinden, da diese letzteren Verbindungen zellschädigende pH-Werte entwickeln und dadurch die Entwicklung der Zellkulturen beeinträchtigen.

## 2. Kollagen-Matrix

Die Herstellung von Kollagen entsprechender Reinheit, d. h. ohne immunologisch bedenkliche Proteine, erfolgt nach einer besonders vorteilhaften Ausführungsart aus tierischen Knochen, vorzugsweise vom Kalb, aber auch vom Menschen. Hierzu werden Knochenstücke in 0,2 normaler HCl entkalkt, sodann wird das entkalkte Material mit Pepsin oder anderen Proteasen behandelt, welche die nicht-kollagenen Proteine "verdauen" und abbauen. Das verbleibende gelförmige Kollagen wird mit HCl oder Essigsäure gelöst und durch Zugabe von  $\text{CaCl}_2$ -Lösung bei  $4^\circ\text{C}$  ausgefällt und von der Lösung getrennt (1. Reinigungsschritt). Zur weiteren Reinigung wird das Kollagen wiederum in HCl aufgelöst und durch erneute Zugabe von  $\text{CaCl}_2$ -Lösung ausgefällt. Diese Reinigung wird insgesamt dreimal wiederholt, wobei ein hochreines, von Fremdproteinen freies Kollagen, Typ I gewonnen wird.

Die Viskosität und der Vernetzungsgrad dieses Kollagens, welches zur Herstellung der Züchtungsmatrix benutzt wird, kann durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in weiten Grenzen eingestellt werden.

## 3. Anzucht der Zellkultur

Hinsichtlich der Anzucht menschlicher Osteoblastenzellen erwies sich folgender Weg als vorteilhaft: Die aus

dem Beckenkamm eines Menschen intra operationem entnommenen Knochenstückchen wurden mittels physiologischer Kochsalzlösung nach Dulbecco von Blut gereinigt und mit 5000 E/ml und 5000 µg/ml Penicillin-streptomycin zum Schutz gegen Infektionen behandelt. Nach nochmaliger Reinigung werden die so behandelten Knochenproben in einer Nährlösung aus 10% fötalem Kälberserum ernährt (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 20% O<sub>2</sub> und 100% relative Luftfeuchtigkeit). Die Nährlösung wurde alle 2 Tage gewechselt. Hierdurch wachsen die Zellkulturen und differenzieren sich zu Osteoblasten.

monolithischer, dem zu behandelnden Knochendefekt angepaßter Form vorliegen.

#### 4. Vermehrung der Zellkultur und Bildung des "Verbundmaterials"

Die so angezüchteten Osteoblasten werden nach einer vorteilhaften Arbeitsweise mittels 0,03% Ethylendinitrotetraessigsäure-Lösung dispergiert und mit einer berechneten Konzentration von ca. 3600 Zellen/cm<sup>2</sup> Substrat in die poröse Calciumphosphat-Matrix eingeschwemmt. Nach einer zweistündigen Ruhezeit haben sich die Zellen auf der Keramik abgesetzt. Dann wird mit der Durchflutung der Zelle mit Nährlösung begonnen. Die chemische Zusammensetzung und insbesondere der P<sub>H</sub>, PCO<sub>2</sub>, PO<sub>2</sub> werden in der austretenden Lösung laufend gemessen. Wenn sich die Lösung durch die Zellaktivität und durch partielle Anlösung der CaP-Matrize meßbar ändert, wird die einströmende Nährlösung entsprechend korrigiert. So ist gewährleistet, daß die Zellen stets optimale Lebensbedingungen behalten und die gesamte durchströmte Matrize oberflächlich mit einem dichten "Zellrasen" überziehen. Dies ist nach ca. 2 Wochen der Fall.

#### Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines synthetischen Knochenmaterials mit körpereigenen Eigenschaften, dadurch gekennzeichnet, daß man menschliche Knochenzellen (Präosteoblasten und Osteoblasten) extrakorporal auf den dem natürlichen Knochenmineral ähnlichen calciumphosphatischen Werkstoffen, Substratmaterialien in Form von Biopolymeren oder Mischungen aus beiden züchtet.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man als calciumphosphatische Werkstoffe dem Verhältnis CaO:P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> = 3:1 möglichst eng entsprechende Calciumphosphate und als Biopolymere Kollagen verwendet.
3. Verfahren nach Ansprüchen 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, daß man autologe Knochenzellen verwendet.
4. Verfahren nach Ansprüchen 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, daß man einem fremden, aber immunologisch geeigneten Patienten entstammende Knochenzellen verwendet.
5. Verfahren nach Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß man die auf den Matrizen abgelagerten Zellkulturen von der Nährlösung ständig umströmen läßt.
6. Verfahren nach Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Matrixmaterialien eine durchgängige poröse Form haben.
7. Verfahren nach Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Matrixmaterialien in granulärer Form vorliegen.
8. Verfahren nach Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die porösen Matrixmaterialien in

- Leerseite -

Num.  
Int.  
Anmeldetag:  
Offenlegungstag:

38 10 803  
A 61 L 27/00  
30. März 1988  
12. Oktober 1989

3810803

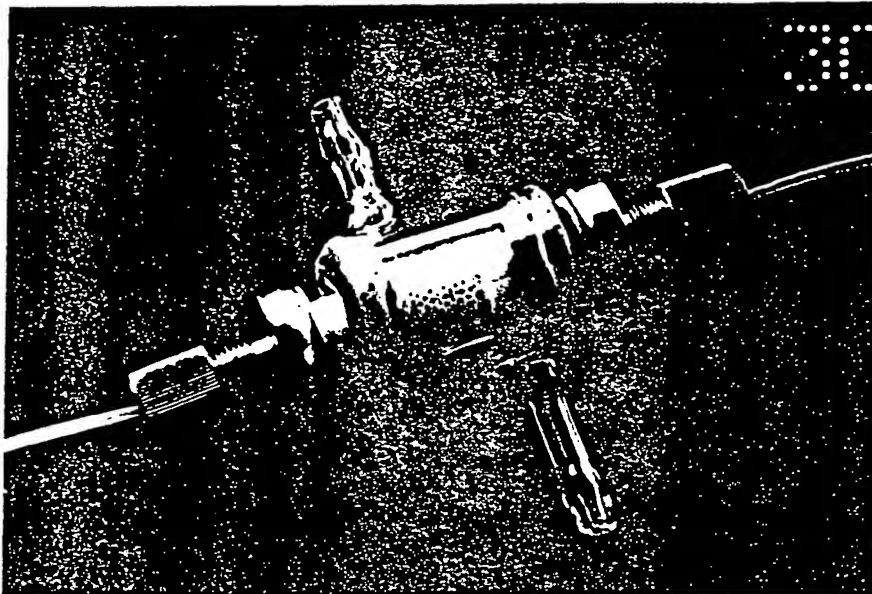


ABB. 1



ABB. 2 a

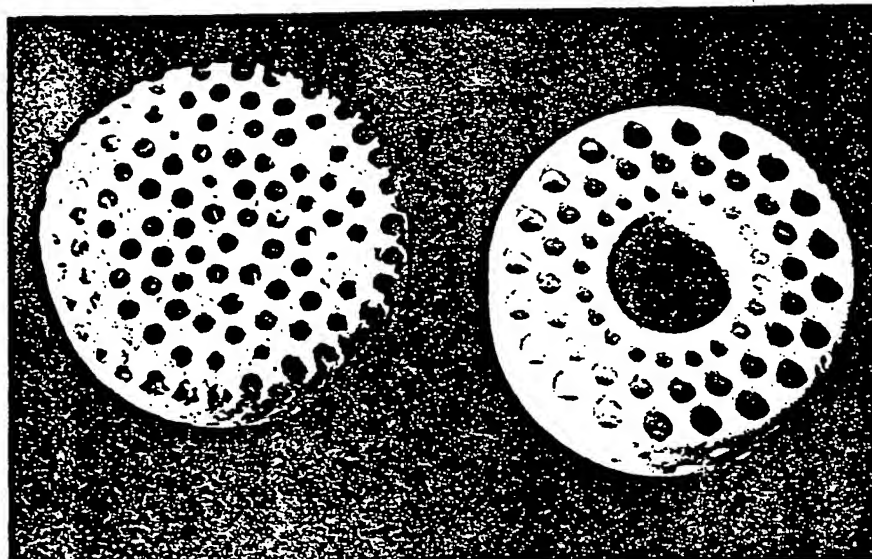


ABB. 2 b

3810803

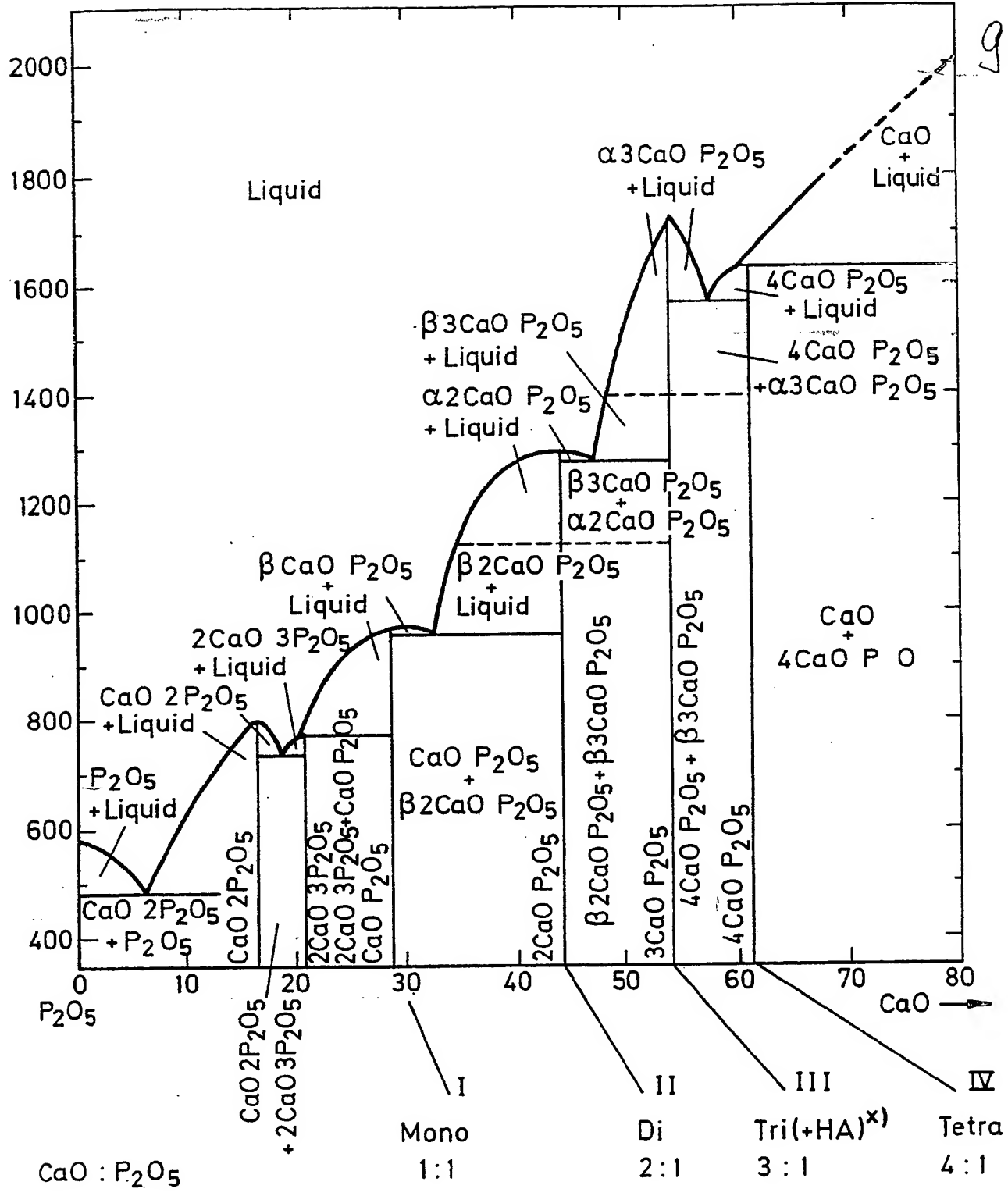


Fig.3